

ЦИТОПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ ТАУЦИНА У КРЫС С ПОРАЖЕНИЕМ КЛУБОЧКОВ НЕФРОНОВ СУЛЕМОЙ

БАСАЛАЙ О.Н., КРАВЧУК Р.И., БУШМА К.М., МИХАЛЬЧУК Е.Ч., ЗИМАТКИН С.М., ШЕЙБАК В.М.

УО «Гродненский государственный медицинский университет», Республика Беларусь

Резюме.

Целью исследования явилось изучение цитопротекторного действия комбинации таурина с цинка диаспаратом (тауцином) на пораженные сулемой клубочки нефронов крыс. Эксперименты проведены на 42 беспородных крысах-самцах. Сулему вводили внутривентрально в дозе 0,1 мг/кг/день в течение 14 дней. Тауцин (20 г/моль таурина – 2,5 г. и 1 г/моль цинка диаспартата – 0,35 г.) вводили в желудок в виде взвеси в слизи крахмала в дозе 500 мг/кг, 1 раз в день вместе с сулемой. Обнаружено цитопротекторное действие тауцина по отношению к подоцитам почечных телец корковых нефронов (КН). Под его влиянием увеличиваются сниженные: объем полости капсулы (на 50%), количество цитоподий (на 25%) и снижаются увеличенные: межподоцитарные пространства (на 50%), толщина базальной мембраны (на 22%). Как следствие, улучшается функция органа, судя по увеличению экскреции мочевины (на 38%), креатинина (на 32%), клиренса последнего (на 56%); ослабляются проявления полиурии. В механизме цитопротекторного действия тауцина играет роль способность таурина хелатировать сулему, способствуя ее экскреции. Он является внутриклеточным осморегулятором и антиоксидантом. Цинк в качестве кофактора входит в состав более 200 ферментов внутриклеточного метаболизма, нарушенного сулемой, в том числе супероксиддисмутазы, обезвреживающей цитотоксичный супероксид-анион.

Ключевые слова: крысы; поражение клубочков нефронов сулемой; комбинация таурина с цинка диаспаратом; цитопротекторное действие.

Abstract.

The aim of this investigation was to study the cytoprotective action of the combination of taurine with zinc diaspertate (taucine) on the damaged with corrosive sublimate glomeruli of nephrons in rats. The experiments have been conducted on 42 mongrel male rats. Sublimate was administered intraperitoneally in a dose of 0,1 mg/kg/day during 14 days. Taucine (20 g/mole of taurine – 2,5 g and 1 g/mole of zinc diaspertate – 0,35 g) was introduced into the stomach in the form of a solution of macromolecules in starch in a dose of 500 mg/kg simultaneously with sublimate once a day. Cytoprotective action of taurine concerning podocytic cells of renal corpuscles in cortical nephrons (CN) has been revealed. It increases the lowered volume of capsular cavity (by 50%), the quantity of cytopodia (by 25%) and decreases the increased intrapoduncular spaces (by 50%), thickness of basal membrane (by 22%). As a result the function of the kidney improves judging by the increase in the secretion of urea (by 38%), creatinine (by 32%), clearance of creatinine (by 56%); polyuria manifestations decrease. In the mechanism of this cytoprotective action of taurine the binding properties of taurine concerning sublimate play their role, promoting its excretion. It is an intracellular osmoregulator and an antioxidant. Zinc as a cofactor is a component of more than 200 enzymes of the intracellular metabolism disturbed with sublimate, including superoxiddismutase, which neutralizes cytotoxic superoxid-anion.

Key words: rats; damage of nephrons glomeruli with sublimate, combination of taurine with zinc diaspertate, cytoprotective action.

Сулема широко применяется в экспериментальной фармакологии для моделирования поражения почек, проявляющегося поражением сосудистых клубочков и эпителия проксимальных извитых канальцев (ПИК), преимущественно корковых нефронов (КН) [1]. В ее патогенезе играет роль связывание с

трансмембранными SH-содержащими ферментами и развитием цитотоксичности [2]. В настоящем исследовании изучены нефрозащитные свойства комбинации таурина с цинка диаспаратом у крыс с сулемовой нефропатией. Основанием для них явились известные антиоксидантные свойства таурина, а также

неорганических (сульфат, нитрат, хлорид) и органических (аспартат, оротат, цитрат) солей цинка. Мы предположили, что их комбинация (тауцин) окажется эффективной при поражении почек сулемой.

Цель исследования – изучить цитопро- текторное действие тауцина при сулемовом поражении клубочков нефронов почек у крыс.

Материал и методы

Выполнено 2 серии исследований.

Первая серия. Опыты проведены на 24 беспородных крысах-самцах массой 200 – 250 г в соответствии с Хельсинской декларацией о гуманном обращении с животными. Сулему (производитель – ООО «Алхим», Украина) вводили внутривентрально в дозе 0,1 мг/кг/день в течение 14 дней. Комбинацию таурина (20 г/моль – 2,5 г) с цинка даспартатом (1 г/моль – 0,35 г) (тауцин для доклинических испытаний – производитель СП ООО «Фармлэнд», Республика Беларусь) вводили в желудок в виде взвеси в слизи крахмала в дозе 500 мг/кг, 1 раз в день вместе с сулемой. Через 2 часа после последнего введения животных помещали в обменные клетки для сбора мочи в течение 24 часов. Затем их декапировали, собирали кровь и получали плазму, извлекали левую почку для гистологических исследований.

Методы оценки строения почечных телец (световая микроскопия). Гистологические препараты окрашивали гематоксилином и эозином [3]. Морфометрические и цитофото- метрические исследования проводили с помощью светового микроскопа Axioskop 2 plus (Zeiss, Германия) при увеличении 200, цифровой видеокамеры (Leica FC 320, Германия), а также компьютерной программы анализа изображения ImageWarp 2,1 (лицензионный номер 151B3D61; BitFlow, США).

Методы оценки маркерных показателей нефротоксичности. В плазме определяли содержание мочевины (энзиматический уреазный метод), креатинина (метод Илька с пикриновой кислотой); рассчитывали клиренс последнего (проба Реберга). В моче – мочевины и креатинина (см. выше), содержание белка (биуретовый метод) [4]. Измеряли суточный диурез.

Вторая серия. Опыты проведены на 18 беспородных крысах-самцах массой 200–250 г. Препараты вводили как в первой серии.

Проводили электронно-микроскопическое исследование почечных телец сосудистых клубочков КН. С этой целью образцы ткани коркового вещества почек (1х1 мм) фиксировали 1% раствором четырехокси осмия на 0.1М буфере Миллонига (рН 7,4). После дегидратации в спиртах восходящей концентрации и ацетоне образцы заливали в аралдит. Из полученных блоков на ультрамикротоме MT-7000 ULTRA (USA) готовили полутонкие срезы (400 нм) и окрашивали метиленовым синим. Препараты просматривали в световом микроскопе. Для дальнейшего изучения ультраструктурных изменений выбирали однотипный участок коркового нефрона, на срезе которого находилось не менее 2-х почечных клубочков. Ультратонкие срезы, толщиной 35 нм контрастировали 2%-ым раствором уранилацетата на 50% метаноле и цитратом свинца по E.S. Reynolds. Электронно-микроскопические препараты изучали в электронном микроскопе JEM-1011 (JEOL, Япония) при увеличениях 4 000 - 40 000 и ускоряющем напряжении 80 кВт. Для получения снимков использовали комплекс из цифровой камеры Olympus MegaView III (Германия) и программы iTEM для обработки изображений [5].

Количественную оценку результатов, полученных в обеих сериях, проводили методом непараметрической статистики Манна-Уитни, применяя поправку Бонферрони с использованием пакета программ «Statistica» 6.0.437.0 для Windows (StatSoft, Inc., США), лицензионный номер 31415926535897 [5].

Результаты

Сулема оказывает нефротоксическое действие, что согласуется с литературными данными [6].

Нефротоксическое действие сулемы.

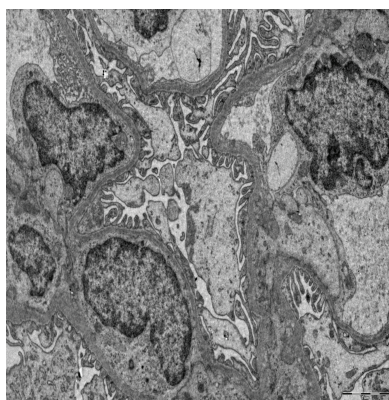
В корковых нефронах увеличиваются диаметры как почечных телец (на 7%), так и переполненных кровью сосудистых клубочков (на 12%). Объем полости капсулы снижен на 17 % («сморщенный клубочек») (табл. 1).

Количество цитоподий подоцитов снижено (на 25%), преимущественно за счет их слияния. Как следствие, двукратно увеличивается межпедикулярное пространство. «Подошвы» цитоподий патологически изменены («бугристый» рельеф профилей) и утолщены (на 21%). Вышеуказанные изменения в совокупности приводят

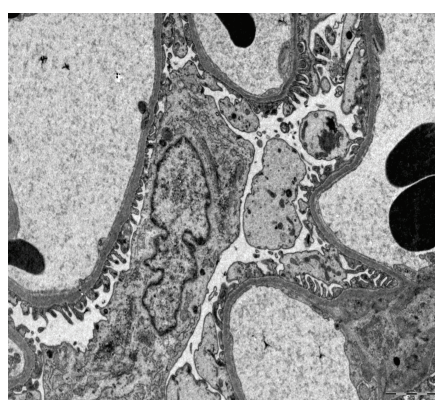
Таблица 1 – Результаты световой и электронной микроскопии морфометрических параметров почечных телец корковых нефронов крыс, получавших в течение 14 дней сулему (внутрибрюшинно, 0,1 мг/кг/день), отдельно, и в комбинации с тауцином (в желудок в виде взвеси в слизи крахмала, 500 мг/кг/день)

| Изучаемые показатели | Контроль | Сулема | Сулема + тауцин, 500 мг/кг |
|--|----------------------|-------------------------------------|--|
| Световая микроскопия почечных телец корковых нефронов | | | |
| Диаметр почечного тельца (мкм) | 84,6 (83,6;85,9) | 90,7 (89,1; 92,7) 0,0008 | 87,9 (86,3; 90,0) 0,008 (0,04) |
| Диаметр сосудистого клубочка (мкм) | 76,3 (75,5;77,6) | 85,2 (84,2; 86,1) 0,0008 | 87,9 (86,3; 90,0) 0,008 (0,04) |
| Объем полости капсулы (см ³) | 84,9 (80,2;88,4) | 70,5 (64,1; 76,3) 0,002 | 105,5 (92,5; 112,8) 0,005 (0,0008) |
| Электронная микроскопия подоцитов сосудистых клубочков корковых нефронов | | | |
| Толщина базальной мембраны (мкм) | 0,21 (0,19;0,21) | 0,32 (0,30; 0,32) 0,004 | 0,25 (0,23; 0,25) 0,008 (0,005) |
| Количество цитоподий на цитотрабекуле на 100 мкм | 305,4 (288,7; 333,4) | 229,5 (205,6;248,8) 0,004 | 288,0 (281,3; 296,1) 0,1 (0,004) |
| Межпедикулярное пространство (мкм) | 0,04 (0,03; 0,04) | 0,08 (0,08; 0,08) 0,0004 | 0,04 (0,03; 0,04) 0,5 (0,004) |
| Средняя толщина цитоподий (мкм) | 0,19 (0,18; 0,20) | 0,24 (0,21; 0,26) 0,016 | 0,19 (0,16; 0,20) 0,9 (0,02) |

Примечание: Первая строка цифр – значения Ме и 25-75% квартилей (в скобках). Вторая – p: без скобок – в сравнении с контрольными, в скобках – с получавшими сулему крысами. Полужирным шрифтом выделены статистически значимые значения p (с учетом поправки Бонферрони).



А



Б



В

Рисунок 1 – Подоциты сосудистых клубочков корковых нефронов крыс:

А – контроль, Б – сулема (деструкция цитоподий почечного тельца), В – сулема + тауцин (нормализация рельефа и структурных элементов почечного тельца). Контрастирование уранилацетатом и цитратом свинца по E.S. Reynolds. Микрофотография x 8000.

к нарушению пространственной организации фильтрационных щелей. Базальная мембрана капилляров сосудистых клубочков КН неравномерно утолщена (на 53%) (табл. 1, рис. 1).

Зеркальным отражением вызываемых сулемой морфологических изменений в почечных тельцах КН (световая, электронная микроскопия) является ухудшение показателей, ха-

рактеризующих функциональную активность органа. Содержание в плазме мочевины и креатинина увеличивается (на 38 и 57% соответственно), а клиренс последнего – снижается (на 25%). Это является следствием ингибирования их экскреции (на 57 и 32% соответственно). Регистрируются протеинурия и полиурия (увеличение соответственно в 2,8 и 2,4 раза) (табл. 2).

Нефрозащитное действие тауцина.

Сравнительный анализ двух групп крыс с сулемовой нефропатией, получавших и не получавших тауцин, свидетельствует о его нефрозащитном действии. Сниженный объем полости капсулы почечного тельца увеличивается на 50%. Структурные элементы почечного тельца КН улучшаются: увеличивается количество цитоподий и нормализуется увеличенное межпедиккулярное пространство. Увеличенная толщина базальной мембраны его кровеносных капилляров снижается на 22% (табл. 1, рис. 1).

Повышенное содержание мочевины и креатинина в плазме снижается (на 20 и 35% соответственно), а в моче – увеличивается (соответственно на 38 и 32%). Сниженный клиренс креатинина возрастает на 56%. Ослабляются проявления полиурии (табл. 2).

Обсуждение

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что сулема (внутрибрюшинно, 0,1 мг/кг/день – 14 доз) обладает нефротоксическим действием. Это подтверждается увеличением диаметров почечных телец и сосудистых клубочков, уменьшением объема поло-

сти капсулы; снижением количества цитоподий подоцитов, увеличением межпедиккулярного пространства, изменением рельефа «подошв» цитоподий и их утолщением, а также утолщением базальной мембраны капилляров сосудистых клубочков КН. Вышеуказанные изменения приводят к нарушению пространственной организации фильтрационных щелей, что сопровождается ухудшением показателей, характеризующих функциональную активность органа. Содержание в плазме мочевины и креатинина увеличивается, а клиренс последнего – снижается; в моче концентрация мочевины и креатинина уменьшается, регистрируются протеинурия и полиурия.

Тауцин (таурин: 20 г/моль – 2,5 г + цинка диаспартат: 1 г/моль – 0,35 г; в желудок, 500 мг/кг/день – 14 доз) оказывает цитопротекторное действие на пораженные сулемой клубочки корковых нефронов крыс. Под его влиянием увеличивается объем полости капсулы почечного тельца КН, исчезает хаотичность расположения цитоподий подоцитов и увеличивается их плотность; уменьшается толщина базальной мембраны капилляров сосудистых клубочков. Следствием этих положительных изменений является увеличение экскреции мочевины, креатинина и клиренса последнего и снижение полиурии.

Таблица 2 – Маркерные показатели нефротоксичности в плазме, моче крыс, получавших сулему (внутрибрюшинно, 0,1 мг/кг/день – 14 доз), отдельно, и в комбинации с тауцином (в желудок в виде взвеси в слизи крахмала, 500 мг/кг/день – 14 доз)

| Изучаемые показатели | Контроль | Сулема | Сулема +тауцин, 500 мг/кг |
|--|-------------------|------------------------------------|---|
| Маркерные биохимические показатели нефротоксичности в плазме | | | |
| Мочевина (ммоль/л) | 3,9 (3,6;4,3) | 5,4 (4,7; 6,0) 0,004 | 4,3 (3,9; 4,7) 0,2 (0,002) |
| Креатинин (ммоль/л) | 54,0(47,1; 62,5) | 85,2 (76,1; 94,3) 0,0008 | 55,5 (49,5; 61,5) 0,9 (0,0008) |
| Клиренс креатинина (мл/ч) | 9,42 (8,76; 9,78) | 7,08 (6,42; 8,22) 0,0008 | 11,08 (10,30; 12,72) 0,002 (0,0008) |
| Маркерные показатели нефротоксичности в моче | | | |
| Мочевина (моль/мл) | 0,26 (0,24; 0,26) | 0,16 (0,15; 0,17) 0,0008 | 0,22(0,20; 0,25) 0,09 (0,0008) |
| Креатинин (моль/мл) | 0,26 (0,25; 0,27) | 0,19 (0,17; 0,18) 0,0008 | 0,25 (0,23; 0,26) 0,09 (0,0008) |
| Белок (г/л) | 0,04 (0,03;0,04) | 0,11 (0,10; 0,13) 0,0008 | 0,10 (0,09; 0,11) 0,0008 (0,04) |
| Суточный диурез (мл/100г. крысы/сут.) | 2,2(1,9; 2,4) | 5,2 (4,9; 6,1) 0,0008 | 4,2 (3,8; 4,6) 0,0008 (0,002) |

Примечание: Первая строка цифр – значения Ме и 25-75% квартилей (в скобках). Вторая – p: без скобок – в сравнении с контрольными, в скобках – с получавшими сулему крысами. Полужирным шрифтом выделены статистически значимые значения p (с учетом поправки Бонферрони).

В механизме цитопротекторного действия тауцина по отношению к подоцитам сосудистых клубочков КН крыс с сулемовой нефропатией играет роль способность таурина хелатировать сулему, способствуя ее экскреции. Кроме того, благодаря наличию в молекуле сульфогруппы таурин обладает антиоксидантными свойствами [7]. Цинк в качестве кофактора входит в состав более 200 ферментов внутриклеточного метаболизма, нарушенного сулемой, в том числе супероксиддисмутазы, обезвреживающей цитотоксичный супероксиданион. Установлена также его способность активизировать внутриклеточный фермент-антиоксидант – глутатионпероксидазу [8].

Заключение

Таурин (таурин: 20 г/моль – 2,5 г. + цинка диаспартат: 1 г/моль – 0,35 г.; в желудок, 500 мг/кг/день – 14 доз) в значительной степени ослабляет проявления сулемовой нефропатии у крыс. Увеличивается объем полости капсулы почечного тельца, исчезает хаотичность расположения цитоподий подоцитов и увеличивается их плотность, а также уменьшается толщина базальной мембраны капилляров сосудистых клубочков КН. Улучшается функция органа: увеличиваются экскреция мочевины, креатинина и клиренс последнего, снижается выраженность полиурии.

Исследование выполнено в рамках ГНТП РБ «Фармацевтические субстанции и лекарственные средства» (подпрограмма «Аминокислоты») по заданию «Разработать цитопротектор и корректор метаболизма эпителиальных

тканей «тауцин» и освоить его производство на СП ООО «Фармлэнд» (2011 – 2019 гг.).

Литература

1. Lash, L. H. Influence of exogenous thiols on inorganic mercury induced injury in renal proximal and distal tubular cells from normal and uninephrectomized rats / L. H. Lash, A. D. Putt, R. K. Zalups // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 1999 Nov. – Vol. 291, N 2. – P. 492–502.
2. Zalups, R. K. Molecular interactions with mercury in the kidney / R. K. Zalups // Pharmacological Reviews. – 2000 Mar. – Vol. 52, N 1. – P. 113–143.
3. Можейко, Л. А. Классические методы окраски в гистологии / Л. А. Можейко // Методы исследования в гистологии / под ред. С. М. Зиматкина. – Гродно : ГрГМУ, 2010. – С. 23–34.
4. Камышников, В. С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике: в 2 т. Т. 1 / В. С. Камышников. – 2-е изд. – Минск : Беларусь, 2000. – 495 с.
5. Watson, M. L. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals / M. L. Watson // J. Biophys. Biochem. Cyt. – 1958 Jul. – Vol. 4, N 4. – P. 475–478.
6. Реброва, О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О. Ю. Реброва. – Москва : МедиаСфера, 2002. – 312 с.
7. Нефедов, Л. И. Таурин: биохимия, фармакология, медицинское применение / Л. И. Нефедов. – Гродно, 1999. – 140 с.
8. The role of zinc in caspase activation and apoptotic cell death / A. Q. Truong-Tran [et al.] // Biometals. – 2001 Sep-Dec. – Vol. 14, N 3/4. – P. 315–330.

Поступила 14.04.2015 г.

Принята в печать 10.06.2015 г.

Сведения об авторах:

Басалай О.Н. – аспирант кафедры фармакологии им. профессора М.В. Кораблева УО «Гродненский государственный медицинский университет»;

Кравчук Р.И. – к.б.н., старший научный сотрудник НИЛ УО «Гродненский государственный медицинский университет»;

Бушма К.М. – к.м.н., доцент кафедры анестезиологии и реаниматологии УО «Гродненский государственный медицинский университет»;

Михальчук Е.Ч. – к.б.н., доцент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии УО «Гродненский государственный медицинский университет»;

Зиматкин С.М. – д.б.н., профессор, заведующий кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии УО «Гродненский государственный медицинский университет»;

Шейбак В.М. – д.м.н., профессор кафедры биологической химии УО «Гродненский государственный медицинский университет».

Адрес для корреспонденции: Республика Беларусь, 230009, г. Гродно, ул. Горького, 80, УО «Гродненский государственный медицинский университет», кафедра фармакологии им. профессора М.В. Кораблева. Тел: +375 (29) 225-66-68, e-mail: basalai2012@mail.ru – Басалай Ольга Николаевна.